

Na 膜輸送体の機能解明にもとづく耐塩性微生物・植物創出に向けた基盤研究

魚住 信之

東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻

概要 植物と、葉緑体の起源であるラン藻には共通する耐塩性に関与する膜輸送体(イオンチャネル・トランスポーター)が存在している。本研究では、細胞内恒常性を支える膜輸送系の生体における役割の解明をはかり、耐塩性に関与する膜輸送体の相関と調節系を調べた。膜輸送体の発現と調節系の解析により、膜輸送体を用いた細胞の耐塩性強化にむけた分子基盤の構築をめざして、主に下記の3つの課題に関する研究を行った。

ラン藻 Na 依存性 K トランスポーターの構造と機能に関する研究と調節因子の役割: 植物や微生物には、Ktr/Trk/HKTトランスポーターと呼ばれる K または Na を透過する輸送体が広く存在している。ラン藻 *Synechocystis* 6803 においても KtrB が機能しており、同様の耐塩性の役割を担っている。KtrB のみでも、K 輸送活性が見出されたが、KtrA と KtrE のどちらかが存在すると KtrB がより活性化することがわかった。KtrA と KtrE の両者ともに、原形質膜に局在していることが明らかとなった。KtrB の Asp336(D336K)と Asp337(D337K)の両置換体は低い活性を示した。R262E はその K 輸送活性を失った。原子スケールモデルから Arg262 は Glu247 と電荷的相互作用を行って、構造上の補強に役立っていることが予測された。Arg262 は良く保存されているアミノ酸でありこの正電荷が構造の安定化に寄与することが示された。

植物 CHX21 および CHX23 の生理的役割: シロイヌナズナの AtCHX(cation/proton exchangers)21 と 23 遺伝子は花粉に発現していることが明らかとなった。二重変異株は稔性が消失した。AtCHX21 と AtCHX23 は花粉管が胚珠に届くための補助を担うことが示唆された。AtCHX23 は K 輸送を行う輸送体として機能していることが示された。花粉管において K および pH の制御に関与することが考えられる。

シロイヌナズナ Na 輸送体 AtHKT1 の耐塩性に関する役割の解析: シロイヌナズナ Na 輸送体 AtHKT1 のプロモーター領域 5.4 kb と 2.3 kb を GUS 遺伝子に結合させたプラスミドを構築して、アグロバクテリウムに導入してそのアラビドプシスに感染させた。さらに、AtHKT1 のイオン選択性を変換した 3 種類のトランスポーター遺伝子を *athkt1* 変異株に導入した。AtHKT1S68G 置換体、小麦のホモログ遺伝子である TaHKT1、耐塩性植物の *Thellungiella halophila* の HKT1 を導入した形質転換体を取得した後は、Na 含有量などを調べて本輸送体の生理的意義と耐塩性への寄与を検討する。

以上の研究で得られた HKT/Trk/Ktr 系トランスポーターと CHX 系トランスポーターの構造、機能および生理学的役割に関する結果は、今後の耐塩性機構や本輸送体の生理的意義の重要性を理解するのに必要な知見になると考えられる。

1. 研究目的

植物と、葉緑体の起源であるラン藻のイオン環境は類似しており、両者には共通する耐塩性に関与する膜輸送体(イオンチャネル・トランスポーター)が存在している。単細胞のラン藻は非常に良い研究材料であり得られた結果は植物への応用が可能である。私たちは、植物とラン藻で

機能する Na および K を輸送する Ktr/HKTトランスポーターを同定して、耐塩性と高浸透圧適応に重要であることを明らかにしてきた。さらに、Na/H アンチポーターがラン藻のチラコイド膜で機能していることを初めて見いだした。生体内ではこれらの輸送体は協調的に機能しており、耐塩性適合物質の合成が始まる前の初期段階で耐塩性とイオ

ン環境の恒常性への適応がはかられる。本研究では、申請者らが機能解析してきた膜輸送体の機能改変と現在新たに見だしつつある重金属に制御を受ける陽イオン輸送体を明らかにすることで、細胞内恒常性を支える膜輸送系の生体における役割の解明をはかり、耐塩性に関する膜輸送体の相関と調節系を調べる。これまでには手がつけられていない膜輸送体の発現と調節系の解析により、膜輸送体を用いた細胞の耐塩性強化にむけた分子基盤の構築をめざす。

本研究は主に下記の3つに関して研究を行った。

- 1 ラン藻 Na 依存性 K トランスポーターの構造と機能に関する研究と調節因子の役割
- 2 シロイヌナズナの稔性に関する花粉に発現する K(Na)/H アンチポーターの関与
- 3 シロイヌナズナ Na 輸送体 AtHKT1 の遺伝子発現制御解析に向けたレポーター遺伝子組換え体の作成

上記の研究を並行してすすめた結果、3に関しては遺伝子導入植物の作成は時間を要することから、本研究期間内にはまだ終了していない。今後も本研究をすすめて、植物の耐塩性機構に関する本輸送体の関与を分子レベルで解き明かしていく予定である。一方、1と2においては投稿論文として報告することができた。1に関しては植物の形質転換工程は時間がかかるため1年間では集結しなかったが、現在も進行中であり、実験を進めていく予定である。

2. 研究結果

ラン藻 Na 依存性 K トランスポーターの構造と機能に関する研究と調節因子の役割

水溶性サブユニット KtrA と KtrE の役割

植物や微生物には、Ktr/Trk/HKT トランスポーターと呼ばれる K または Na を透過する輸送体が広く存在している。一方、この輸送体は一般の動物細胞には存在しない。植物のシロイヌナズナには AtHKT1(AtHKT1;1)が単一コピーとして存在しており、申請者らの報告などから Na 耐性に関わっていることが知られている。光合成細菌のラン藻 *Synechocystis* 6803 においても KtrB が機能しており、同様の耐塩性の役割を担っている。この膜輸送体 KtrB は、Na で活性化される K トランスポーターである。つまり、Na 濃度が高い高塩濃度環境において外部から K を取り込んで耐

塩性を獲得する。KtrB 輸送には、細胞内蛋白質の KtrA と KtrE が必要である。しかし、KtrA と KtrE が不在の場合においても、KtrB の K 輸送活性がわずかであるが有意に検出できることが今回の検討で明らかとなった。本研究では、耐塩性機構に関する Ktr 系の分子機構を詳細に調べる目的で、KtrB の構造と機能、KtrA と KtrE の活性化機構を調べることにした。

図 1 に示すように KtrB のみでも、K 輸送活性が見出されたが、Na 依存性は消失していた。Vibrio の Ktr においても同様に K(Na)輸送活性が見出されており、ある程度の透過性が KtrB 単独に存在する。一方、KtrA と KtrE のどちらかが存在すると KtrB をある程度活性化させることもわ

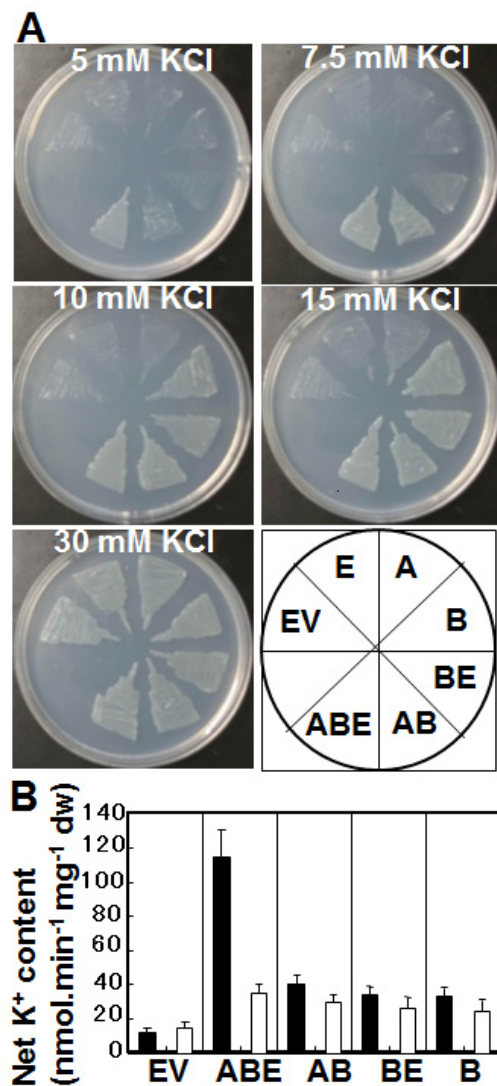


図 1. KtrB は単独でも K 輸送活性を有するが、Na 依存性は消失する。

かった。この場合でも Na 依存性は低い状態のままであった。

KtrE は digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase 活性が報告されている。大腸菌は monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) を生産しないため、DGDG が生産できないと考えられているがその証明はない。そこで、確認実験を行ったところ、予測通り DGDG が新たに KtrE によって合成されることはなかった (図 2)。このことは、KtrE 自体が物理的に KtrB と相互作用して、K 輸送活性を与えることが考えられた。

次に KtrA と KtrE のラン藻における細胞内局在性に関して検討した。ラン藻の膜画分を水性二相分配によって

調製して、KtrA と KtrE のペプチド抗体を調製して抗体検出を行った (図 3)。KtrA と KtrE の両者ともに、原形質膜に局在していることが明らかとなった。両者ともに膜貫通領域はなく、生体膜と相互作用していると考えられた。KtrE の生産物となる DGDG はチラコイド膜に蓄積するが、本結果から KtrE は DGDG を原形質膜で生成して、その DGDG がチラコイド膜に輸送されることが明らかとなった。
KtrB 輸送活性の Na 活性化に関するアミノ酸の検討

KtrB は Na で活性化される機構を探る目的で、細胞外と細胞内側に存在する負電荷アミノ酸を Lys に置換した変異体を作成して、輸送活性に必須となるアミノ酸の同定をめざした。図 4A に示すように、KtrB は 8 回膜貫通領域を

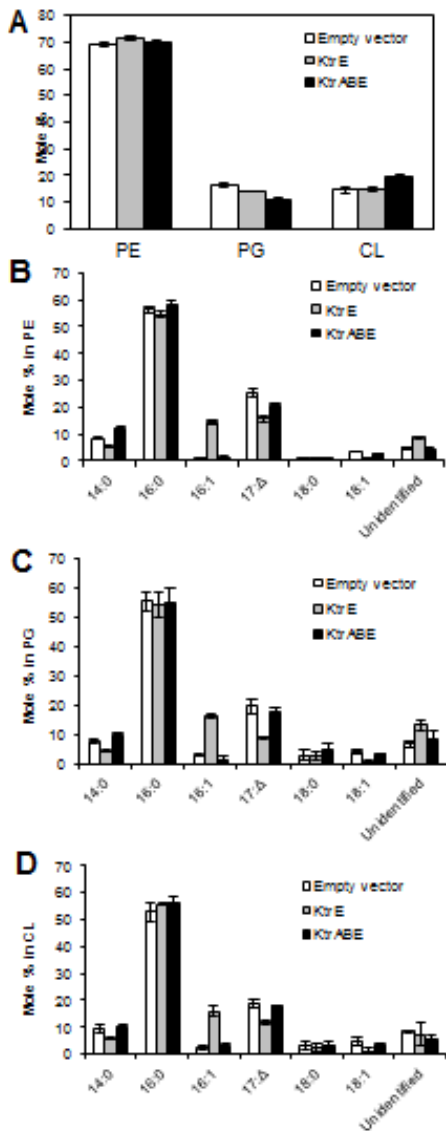


図 2. KtrE を導入した大腸菌の脂質組成

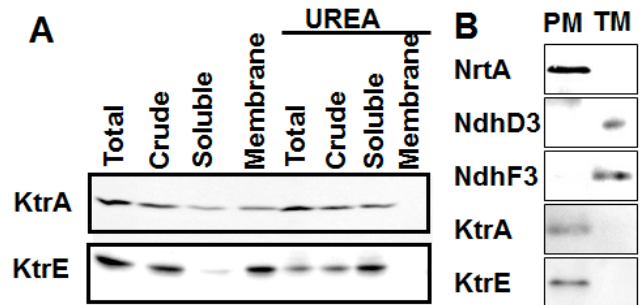


図 3. KtrA と KtrE はラン藻は原形質膜に局在しており、チラコイド膜には局在しない。

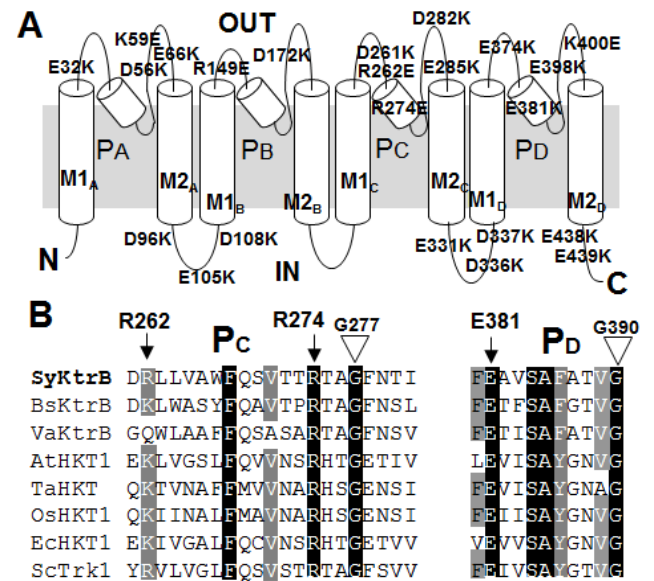


図 4. KtrB に存在する細胞外と内に面する電荷アミノ酸 (A) と輸送活性に必要な Arg262 の保存性 (B)。

とる。膜貫通以外の箇所が存在する負電荷が Na イオンと相互作用する可能性を推定した。細胞外に存在する負電荷アミノ酸を逆電荷に置換しても、活性を完全に失う置換体は得られなかった(図 5)。一方、細胞質側の負電荷アミノ酸の置換体は、輸送活性が非常に小さくなる置換体が存在する。なかでも Asp336(D336K)と Asp337(D337K)の両置換体は低い活性を示した(図 6)。しかし、Na の活性化機構が消失することはなかったことから、輸送活性に影響を与えるアミノ酸であることが予想された。

KtrB の細胞外に面する正電荷アミノ酸の中には、保存性が高い残基や機能活性に必要な His の存在が知られている。そこで、数々存在する細胞外正電荷アミノ酸が輸送活性に寄与しているか否かを検討した(図 7AB)。負電荷アミノ酸 Glu に置換した。その結果、R262E はその K 輸送活性を失った。Arg262 は N 末端から 3 つ目の細胞外ループに存在している。

次に、Ala、Gln または Lys に置換したところ、Glu ほどの輸送活性の低下は検出されなかった(図 7CD)。なかでも負電荷を逆電荷にしても輸送活性に影響がない場合が多いことから、Na の活性化には、電荷だけでは考えられない相互作用が関わっている可能性が高い。また、KtrA と KtrE のどちらかが欠失することで Na 依存性が消失することから、このサブユニットの関与も示唆されている。

Arg262 の役割を明らかにするために、原子スケールモデルを構築して検討を行った(図 8)。Arg262 は Glu247 と電荷的相互作用を行って、構造上の補強に役立っていることが予測された。Arg262 は高く保存されているアミノ酸であり(図 4B)この正電荷が構造の安定化に寄与することが示された。

これまでの報告と今回の結果から KtrB は多くの分子内相互作用があり、膜内で高次構造を形成していることアミノ酸が明らかとなった。この相互作用は、開閉状態の維持

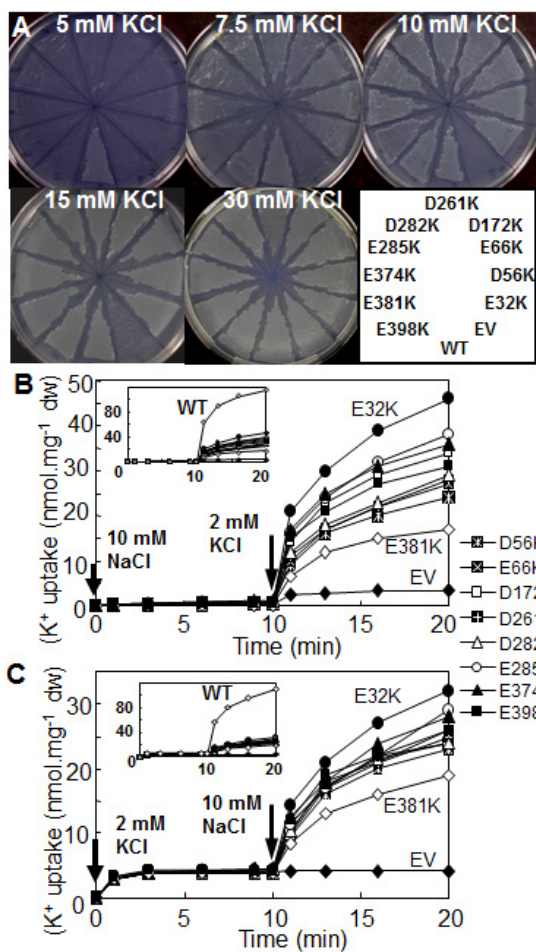


図 5. KtrB の細胞外に存在する負電荷アミノ酸の輸送活性に関する影響

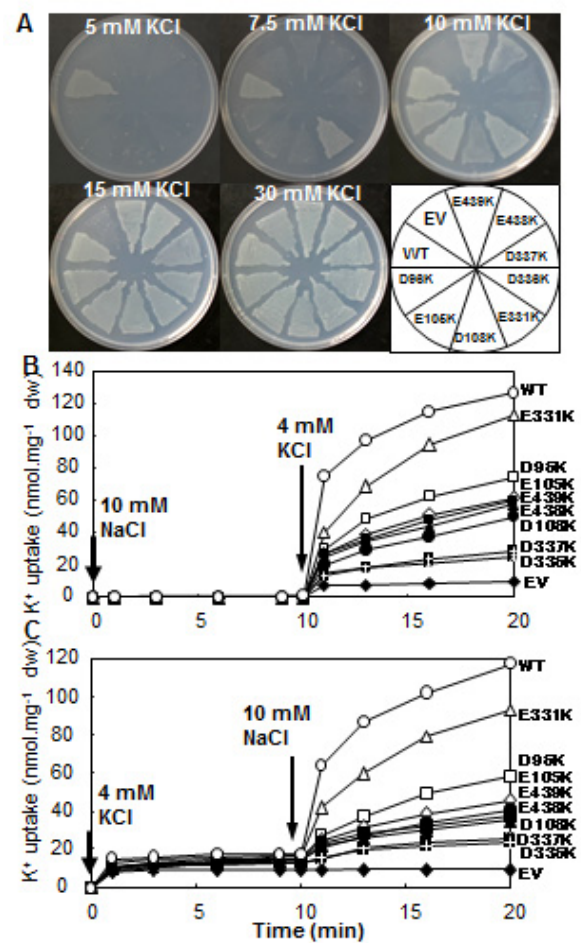


図 6. 細胞内負電荷アミノ酸の輸送活性への寄与

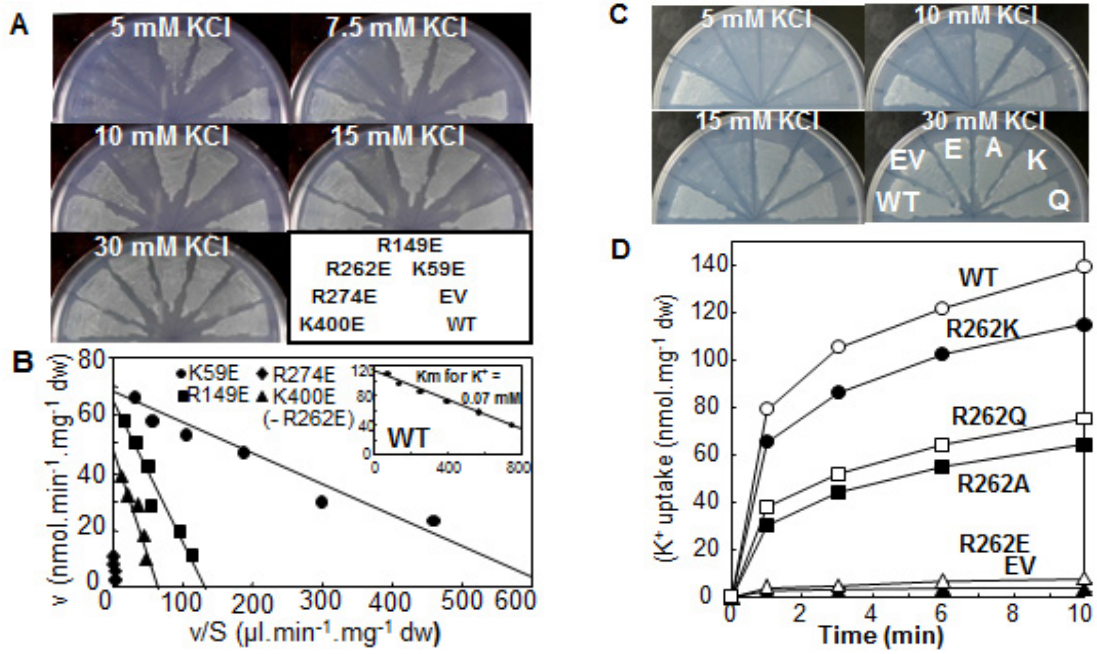


図 7. 細胞外に面する正電荷アミノ酸の輸送活性への寄与

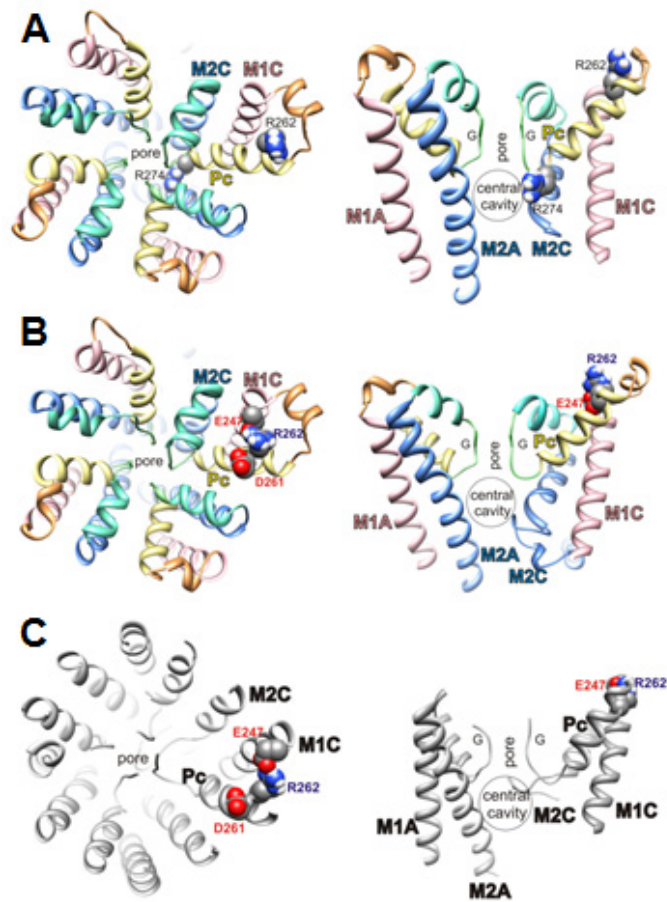


図 8. Arg262 と Glu247 の分子内相互作用のモデル図。両アミノ酸は細胞外に存在しており、構造形成に重要な架橋を形成している。

に貢献している場合があり、両状態における相互作用のどちらかの安定化に必要となる可能性が大きい(Zulkifli *et al.*, 2010)。

植物 CHX21 および CHX23 の生理的役割

シロイヌナズナの 28 個の異なる *AtCHX*(cation/proton exchangers) 遺伝子は陽イオン/H アンチポーターをコードしている。10 個以上の *AtCHX* が花で発現していることが分かっている。また、*AtCHX* の多くが原形質膜以外の細胞内小器官で発現していることも予測されている。しかし、その理由やその輸送体の活性や役割に関する情報の報告は少ない。本研究では、*AtCHX21* と *AtCHX23* に焦点を絞って、本輸送体の植物における役割と機能測定に関して検討を行った。*atchx21* と *atchx23* の変異株の確認を RT-PCR によって行った(図 9)。花粉に両遺伝子ともに

発現していることが明らかとなった。次に、変異株の表現型を調べたところ二重変異株の稔性が消失していることが分かった。そこで、花粉管の伸長を観察した(図 10)。花粉管の伸長を GUS 活性でモニターすることのできるように、pollen-specificLAT52 promoter 下流に *gus* 遺伝子を導入した植物体に *atchx21* と *atchx23* 変異をさらに導入したシロイヌナズナを育成して検討を行った。野生株と同様に、変異株においても花粉管の伸長は観察された。しかし、花粉管が胚珠(いわゆる卵細胞)に到達する機能が阻害されることが分かった。このことから、*AtCHX21* と *AtCHX23* は花粉管が胚珠に届くための補助を担っていることが示唆された。

AtCHX23 に関する輸送機能は報告されていないことから、大腸菌発現系を用いて機能解析を行った。大腸菌は植物の膜輸送体の機能解析系として有効であることをすでに報告している。このことを利用して、*AtCHX23* の輸送活性を測定した(図 11)。*AtCHX23* の発現する K 取り込み系に変異大腸菌では、対照と比較して K 取り込む方向に

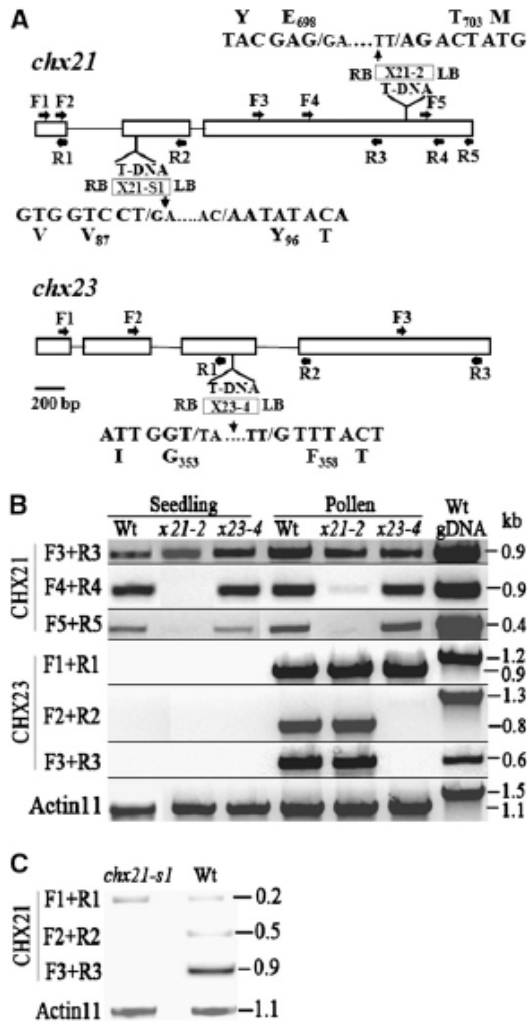


図 9. 花粉管の伸長の 6 時間目と 24 時間目の野生株と変異株の様子

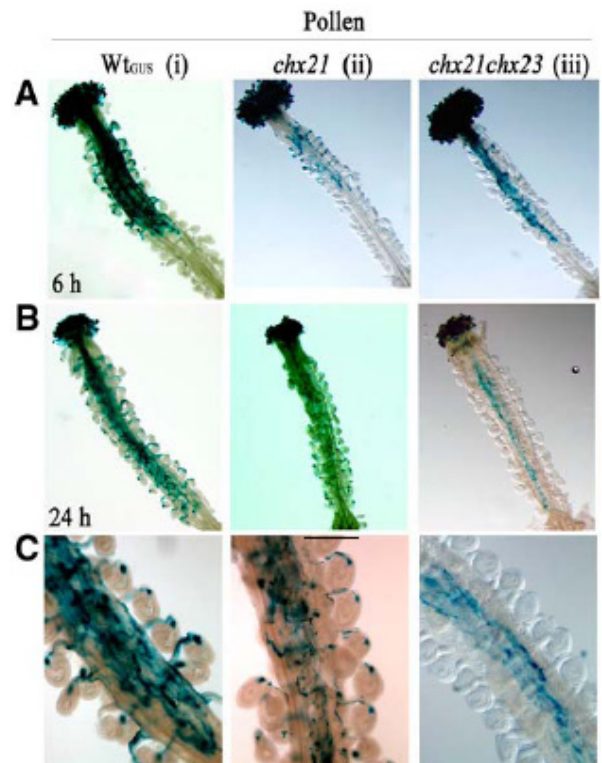


図 10. *AtCHX21* と *AtCHX23* の遺伝子変異株。(A) T-DNA の挿入位置、(B および C) RT-PCR による全長転写物の検出

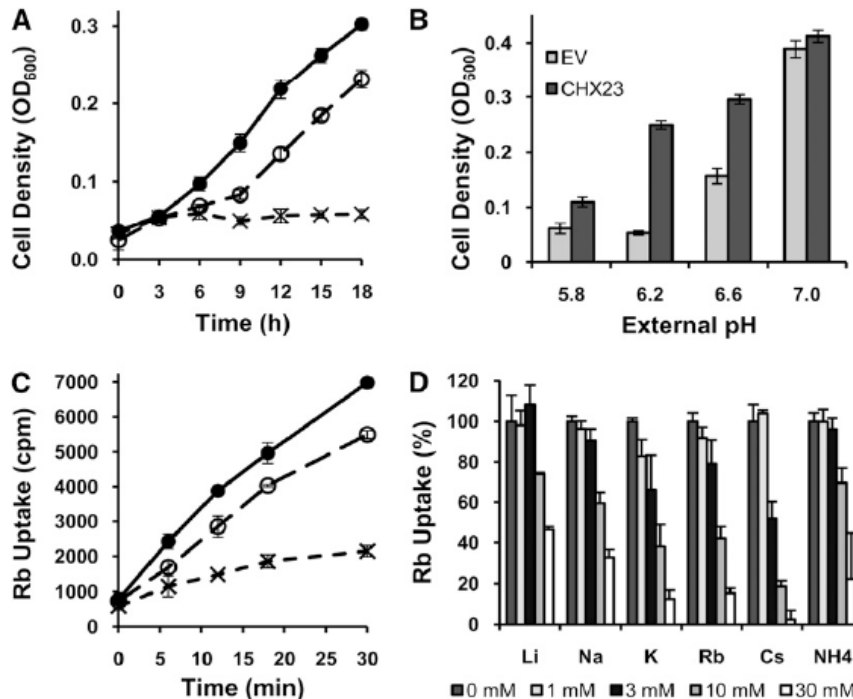


図 11. (A) 大腸菌 K 輸送体変異株にベクター(x)、KAT1 K チャンネル(○)、AtCHX23(●) pH 6.2。 (B) AtCHX23 発現大腸菌の増殖 pH 5.8, 6.2, 6.6, or 7.0. 14 時間培養。 (C) 86Rb の大腸菌による吸収量 pH 6.2。 (D) AtCHX23 発現大腸菌による 86Rb(1 mM) 吸収。 様々な一価陽イオン濃度共存 pH 6.2。

輸送機能が見出された。このことから、AtCHX23 は K 輸送を行う輸送体として機能していることが示唆された。花粉管において K および pH の制御に関与することが考えられる (Lu *et al.*, Plant Cell 2011)。

シロイヌナズナ Na 輸送体 AtHKT1 の耐塩性に関する役割の解析

シロイヌナズナ Na 輸送体 AtHKT1 の遺伝子発現制御解析に向けたレポーター遺伝子組換え体の作成を行った。AtHKT1 のプロモーター領域 5.4 kb を GUS 遺伝子に結合させたプラスミドを構築して、アグロバクテリウムに導入してそのアラビドプシスに感染させた。AtHKT1 プロモーターの 5 kb 上流には direct repeat 配列が存在している。この配列が遺伝子発現制御に関与している可能性が報告されていることから、それを含んだプロモーターとそれを含まない 3.2 kb の GUS 遺伝子融合プラスミドも同時に導入した。現在、植物を生育させているところであり、種子を獲得した後、Na などの環境ストレスに関する遺伝子発現を調べることとしている。以前に、0.8 kb プロモーターを用いた遺伝子発現解析を行ったことがあったが、その上流が

遺伝子発現に関与する可能性が示唆されていることから本解析をすすめる。

さらに、AtHKT1 のイオン選択性を変換したトランスポーター遺伝子を *athkt1* 変異株に導入している。AtHKT1 は Na 選択性の高いトランスポーターであるが、HKT/Trk/Ktr 系の多くが K 透過性であることが分かっている。Na 透過性である理由を探るため、S68G 置換体を作成した。本置換体は、K を透過する活性が強いことをすでに証明されており、この遺伝子を導入する。本遺伝子の発現は AtHKT1 プロモーター制御で行えるようにプラスミドを構築して、アグロバクテリウムに導入し、その後シロイヌナズナ変異株に感染させている。さらに、小麦のホモログ遺伝子である TaHKT1 も導入している。TaHKT1 は K 透過性が高い輸送体であり、AtHKT1 との比較実験に用いる。さらに、耐塩性植物の *salt cress* (*Thellungiella halophila*) からの HKT1 に関しても同様に植物体に導入している。本トランスポーターは AtHKT1 と同源性が高く同様の機能活性を示す可能性があると思えるが、シロイヌナズナよりも耐塩性が強い植物由来であることから、より高い耐塩性に関

わっている可能性に関して調べる。形質転換体が取得した後は、Na 含有量などを調べることにより、本輸送体の生理的意義と耐塩性への寄与を検討する。

3. 今後の展開

ラン藻も植物も Na は塩害を起こす素であるだけでなく、ある濃度の Na が生存活動にされていることを輸送体の研究から推定される。他のイオンとのバランスをとり、浸透圧調節や膜電位やイオン濃度勾配の形成と恒常性維持に関わっている(Akai *et al.*, 20011)。本輸送体に関する研究をさらにすすめて、環境に適応した生物のイオン環境の理解を図っていく必要があると思われる。

投稿原著論文

Zulkifli, L., Akai, M., Yoshikawa, A., Shimojima, M., Ohta,

H., Guy HR., and Uozumi, N. The KtrA and KtrE subunits are required for Na⁺ dependent K⁺ uptake by KtrB across the plasma membrane in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Bacteriol.* 192, 5063-5070, (2010)

Lu, Y., Chanroj, S., Zulkifli, L., Johnson, MR., Uozumi, N., Cheung, A., and Sze, H. Pollen tubes lacking a pair of K⁺ transporters fail to target ovules in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 23, 81-93, (2011)

Akai, M., Onai, K., Kusano, M., Sato, M., Redestig, H., Toyooka, K., Morishita, M., Miyake, H., Hazama, A., Checchetto, V., Szabo, I., Matsuoka, K., Saito, K., Yasui, M., Ishiura, M., and Uozumi, N. Plasma membrane aquaporin AqpZ is essential for glucose metabolism during photomixotrophic growth of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* In press, (2011)

Study on Salt Tolerance Conferred by Na Transporters in Bacteria and Plant Cells

Nobuyuki Uozumi

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University

Summary

It is known that HKT/Trk/Ktr and CHX are essential for the adaptation of bacteria and plant cells to salinity stress and high osmolality. In this study, we have examined the cyanobacteria Ktr, Arabidopsis CHX and HKT to gain insight on the mechanism of the salinity stress response. While *Synechocystis* Na-dependent K uptake KtrABE system, KtrB forms the K-translocating pore, the role of the subunits, KtrA and KtrE for Ktr function remains elusive. Here we characterized the expression of KtrB alone in a K uptake-deficient *E. coli* strain conferred low K uptake activity that was not stimulated by Na. Coexpression of both KtrA and KtrE with KtrB increased the K transport activity in a Na dependent manner. KtrA and KtrE were found to be localized to the plasma membrane in *Synechocystis*. Replacing negatively charged residues facing the extracellular space with residues of the opposite charge increased the apparent Km for K in all cases. However, none of the mutations eliminated the Na dependency of Ktr-mediated K transport. Mutations of residues on the cytoplasmic side had larger effects on K uptake activity than those of residues on the extracellular side. Further analysis revealed that replacement of R262, well conserved among Ktr/Trk/HKT transporters in the third extracellular loop, by Glu abolished transport activity. The atomic-scale homology model indicated that R262 might interact with E247 and D261. Based on these data, interaction of KtrA and KtrE with KtrB increased the K uptake rate and conferred Na dependency.

Flowering plant reproduction requires precise delivery of the sperm cells to the ovule by a pollen tube. We showed that two predicted cation/proton exchangers (CHX) in *Arabidopsis thaliana*, CHX21 and CHX23, are essential for pollen tube guidance. Double mutant pollen grains germinated and grew tubes down the transmitting tract, but the tubes failed to turn toward ovules. Furthermore, chx21 chx23 pollen tubes failed to enter the micropyle of excised ovules. CHX23 mediated K transport, as CHX23 expression in *E. coli* increased K uptake and growth in a pH-dependent manner. We propose that by modifying localized cation balance and pH, these transporters could affect steps in signal reception and/or transduction that are critical to shifting the axis of polarity and directing pollen growth toward the ovule.

We also have constructed the AtHKT1 mutant which has K transport activity, and wheat HKT and salt cress HKT into the Arabidopsis *athkt1* mutant to evaluate the importance of the ion selectivity of AtHKT1. Moreover to monitor the expression pattern of AtHKT1, we introduced the AtHKT1 promoter::GUS gene into the wild type Arabidopsis. Through the above study, we have acquired the knowledge of Na adaptation mechanism and role of the cation-mediated transporters in bacteria and plant cells.